

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 9 日 (09.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/083073 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07H 21/04, C12N 9/22

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003052

(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 24 日 (24.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-055086 2004 年 2 月 27 日 (27.02.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県
川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浅沼 浩之
(ASANUMA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒3320021 埼玉県川口
市西川口 2-1 1-2 1-7 0 1 Saitama (JP). 小宮山
真 (KOMIYAMA, Makoto) [JP/JP]; 〒1500022 東京都
渋谷区恵比寿南 3-1 1-1 7-3 0 8 Tokyo (JP). 松
永 大次郎 (MATSUNAGA, Daijiro) [JP/JP]; 〒1330054
東京都江戸川区上篠崎 1-1 0-6-2 1 9 Tokyo (JP).
倉持 壮 (KURAMOCHI, Takeshi) [JP/JP]; 〒1770034
東京都練馬区富士見台 4-3 6-4 0 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 本多 一郎 (HONDA, Ichiro); 〒1010065 東京
都千代田区西神田二丁目 5 番 7 号神田中央ビル 2 階
2 0 1 号室 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DNA ENZYME AND METHOD OF CONTROLLING THE ACTIVITY THEREOF

(54) 発明の名称: DNA エンザイムおよびその活性制御方法

(57) Abstract: It is intended to provide a DNA enzyme having a largely improved RNA cleavage activity compared with the existing DNA enzymes; and a method of controlling activity whereby the RNA cleavage activity of the DNA enzyme can be reversibly controlled by light irradiation. Namely, a DNA enzyme in which a nucleotide residue carrying an organic group selected from the group consisting of azobenzene, spiropyran, stilbene and derivatives thereof bonded thereto is transferred into the end in the 3' -side of the catalytic activity loop; and a method of controlling activity comprising, in controlling the RNA cleavage activity of a DNA enzyme, irradiating a DNA enzyme, in which a nucleotide residue carrying an organic group selected from the group consisting of azobenzene, spiropyran, stilbene and derivatives thereof bonded thereto is transferred, with light at a definite wavelength to thereby reversibly convert the planar structure the organic group into the non-planer structure (i.e., structural isomerization).

(57) 要約: これまでの DNA エンザイムに比し大幅に RNA 切断活性を向上させた DNA エンザイム、および、
光照射により可逆的に DNA エンザイムの RNA 切断活性を制御することができる活性制御方法を提供する。
DNA エンザイムの触媒活性ループの 3' 側の端に、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘
導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されている DNA エンザイ
ム、および DNA エンザイムの RNA 切断活性を制御するにあたり、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンお
よびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されている
DNA エンザイムに対し、特定波長の光を照射することにより該有機基を平面構造と非平面構造とに可逆的に構造
異性化させることによる活性制御方法である。

WO 2005/083073 A1

明 細 書

DNAエンザイムおよびその活性制御方法

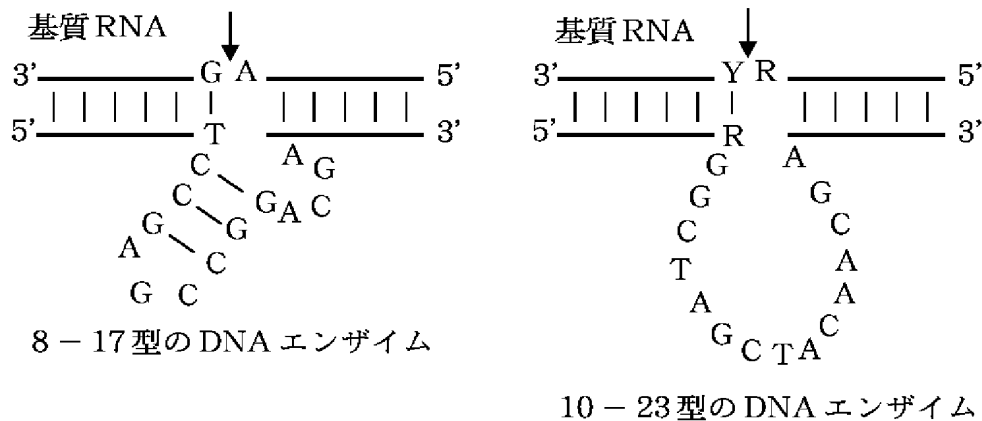
技術分野

- [0001] 本発明は、DNAエンザイムおよびその活性制御方法に関し、詳しくは、天然の4つの塩基のみで構成されるDNAエンザイムよりRNA切断活性を大幅に向上させたDNAエンザイム、および、特定波長の光照射によるDNAエンザイムの活性制御方法に関する。

背景技術

- [0002] RNAを配列選択的に加水分解することが可能となれば、メッセンジャーRNAのレベルでの遺伝子発現を抑制することが可能となり、遺伝子に基づく疾病の治療への応用が期待できる。天然に存在するRNA分解酵素はたんぱく質ではなく、RNAのみから構成されており、リボザイムと呼ばれている。しかしRNAは不安定で分解されやすいため、より安定なDNA加水分解酵素(人工酵素)が求められていた。その要請に対し、1997年にアメリカのJoyceらによって世界で初めて天然のDNAのみから構成されるRNA加水分解酵素が提案された(非特許文献1)。
- [0003] DNAのみから構成されるRNA加水分解酵素は一般的にDNAエンザイム(デオキシリボザイム、DNAザイム)と称され、in vitro selection法により開発された人工リボヌクレアーゼであり、生体内金属である Mg^{2+} をコファクターとすることからin vivoでの応用が可能である。その具体的内容は非特許文献1に開示され、8-17型のDNAエンザイムと10-23型のDNAエンザイムがあり、その配列式は以下のようになっている。

[0004]



[0005] 上記配列式中の矢印は切断部位を示す。切断部位における基質RNAの塩基配列は、8-17型のDNAエンザイムの場合はGAとなり、10-23型のDNAエンザイムの場合はY(UまたはC)R(AまたはG)となる。DNAエンザイムの配列は基質RNAと相補的な配列となる。ただし、8-17型のDNAエンザイムにおけるCCGAGCCGG ACGA(配列番号1)や10-23型のDNAエンザイムにおけるGGCTAGCTACAA CGA(配列番号2)は触媒活性ループであり、基質RNAと相補的ではない。

[0006] 一方、光照射による遺伝子発現制御に関しては、非特許文献2に報告されており、その遺伝子発現制御は、アゾベンゼンをDNAの側鎖に導入した人工DNAを用いることにより行われる。具体的には、アゾベンゼンは特定波長の光照射によりトランス体(平面構造)とシス体(非平面構造)とに可逆的に構造異性化されるため、このアゾベンゼンの特性を利用することにより、DNAの二重鎖の形成と解離の光制御、三重鎖形成の光制御等を行うことが可能となる。

非特許文献1: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94.4262-4266(1997)

非特許文献2: Journal of Japanese Society for Biomaterials 21.290-296(2003)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 非特許文献1に示されるDNAエンザイムはRNA切断活性そのものは決して高くなく、天然のリボザイムと比較すると活性は非常に低いものである。そこでDNAエンザ

イムの高活性化が望まれている。

[0008] また、DNAエンザイムのRNA切断活性を制御することは極めて困難とされており、反応系内の条件を変化させることなく、外部刺激、例えば、光照射により、可逆的に活性制御することができれば、その有用性は大幅に向上し得るものである。

[0009] そこで、本発明の目的は、これまでのDNAエンザイムに比し大幅にRNA切断活性を向上させたDNAエンザイムを提供することにある。

[0010] また、本発明の他の目的は、光照射により可逆的にDNAエンザイムのRNA切断活性を制御することができる活性制御方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、DNAエンザイムの所定の部位に平面構造を有するヌクレオチド残基を導入することにより、上記目的を達成し得ることを見出し、本発明のDNAエンザイムを完成するに至った。

[0012] 即ち、本発明のDNAエンザイムは、DNAエンザイムの触媒活性ループの3'側の端に、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されていることを特徴とするものである。

[0013] また、本発明者らは、上記DNAエンザイムに特定波長の光を照射することで上記平面構造を非平面構造に可逆的に構造異性化させることができ、これによりDNAエンザイムのRNA切断活性を制御することができ、上記他の目的を達成し得ることを見出し、本発明の活性制御方法を完成するに至った。

[0014] 即ち、本発明の活性制御方法は、DNAエンザイムのRNA切断活性を制御するにあたり、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されているDNAエンザイムに対し、特定波長の光を照射することにより該有機基を平面構造と非平面構造とに可逆的に構造異性化させることを特徴とするものである。

発明の効果

[0015] 平面構造を有するヌクレオチド残基が導入された本発明のDNAエンザイムは、天然の4つの塩基のみで構成されるDNAエンザイムと比較し、RNA切断活性が大幅

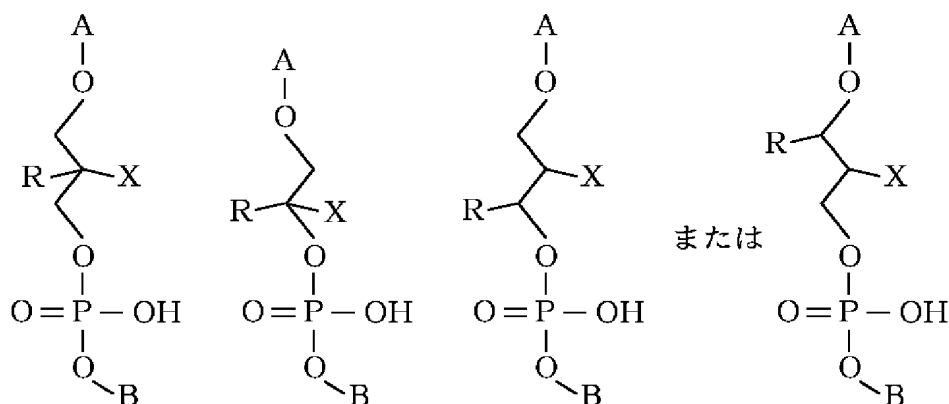
に向上する。また、本発明のDNAエンザイムの活性制御方法によれば、特定波長の光の照射により可逆的にDNAエンザイムの切断活性を制御することが可能となり、*in vivo*での遺伝子発現の光制御が期待できる。

発明を実施するための最良の形態

[0016] 以下、本発明の実施の好適形態を具体的に説明する。

本発明のDNAエンザイムは、前記非特許文献1記載のDNAエンザイムの触媒活性ループの3'側の端に、平面構造を有するアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入され、化学修飾されたものである。かかるDNAエンザイムの塩基配列は触媒活性ループを除き、基質RNAと相補的な塩基である。ただし、RNAの塩基配列は、特に制限されるものではない。

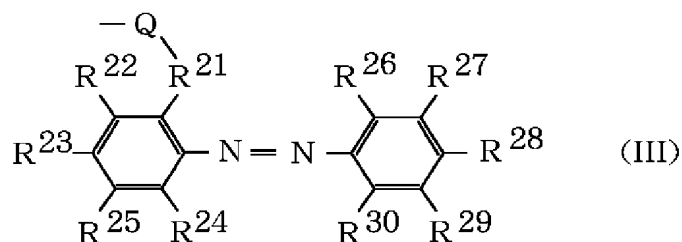
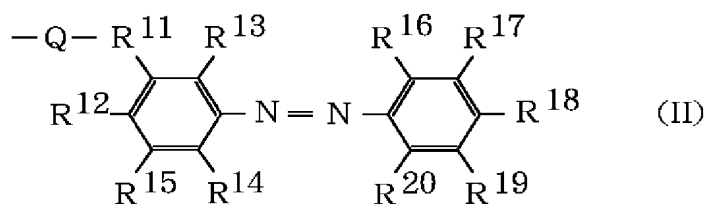
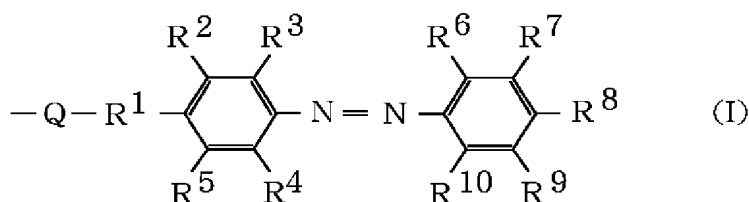
[0017] 本発明のDNAエンザイムは、例えば、次式で表される。



[0018] 上記式中、Aは触媒活性ループ端を表し、Bはヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを表す。また、Xはアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基を表す。Rは未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20、好ましくは1〜10、より好ましくは1〜4のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20、好ましくは2〜10、より好ましくは2〜4のアルケニル基もしくはアルキニル基；水

酸基;ハロゲン原子;アミノ基;ニトロ基;またはカルボキシル基を表す。

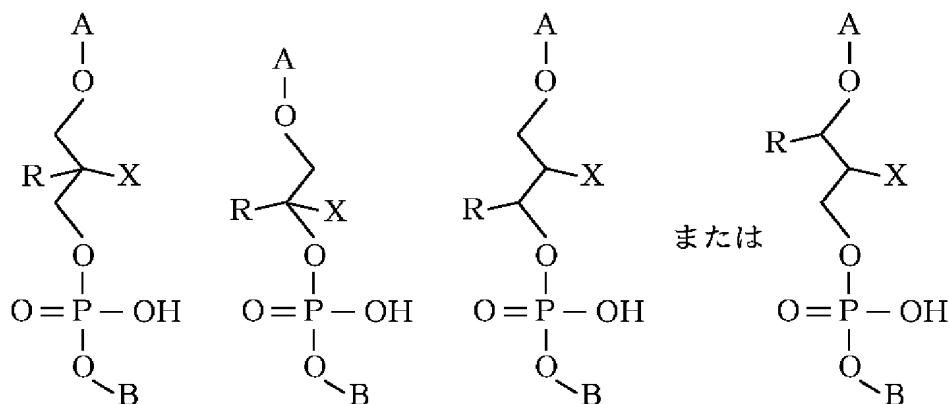
[0019] 前記Xは、好ましくは、アゾベンゼンまたはその誘導体である。また、ヌクレオチド残基との結合部にいかなる介在基を有していてもよい。Xとしては、例えば、次式(I)、(II)または(III)で表される有機基を挙げることができる。



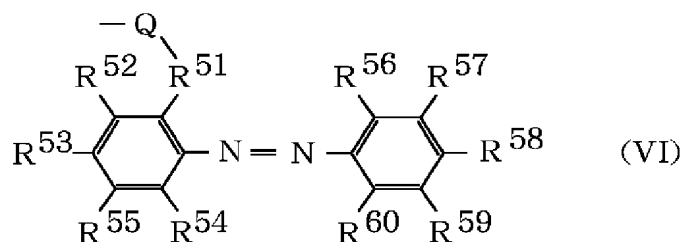
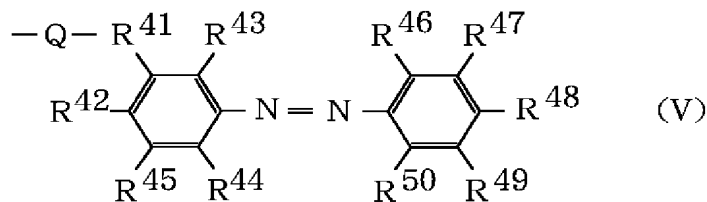
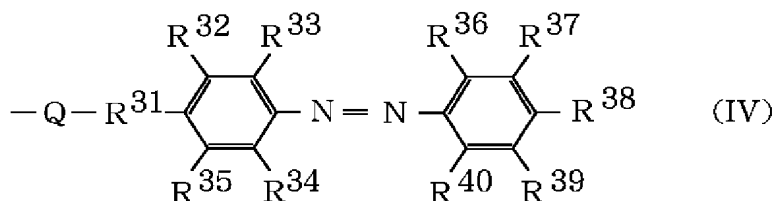
[0020] 上記式(I)、(II)および(III)中、 R^1 、 R^{11} 、 R^{21} は夫々直接の結合;未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20、好ましくは1〜10、更に好ましくは1〜4のアルキレン基、または未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20、好ましくは2〜10、更に好ましくは2〜4のアルケニレン基である。Qは、直接の結合、酸素原子、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{CO}-$ 基または $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-$ 基、但し $n=1\sim5$ である。 $\text{R}^2\sim\text{R}^{10}$ 、 $\text{R}^{12}\sim\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{22}\sim\text{R}^{30}$ は夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20、好ましくは1〜10、更に好ましくは1〜4のアルキル基もしくはアルコキシ基;未置

換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20、好ましくは2〜10、更に好ましくは2〜4のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシル基を表す。

- [0021] 本発明に係るヌクレチド残基の導入されたDNAエンザイムの合成は、既知の手法、例えば、The Journal of Organic Chemistry 62.846-852(1997)、Tetrahedron Letters 39.9019-9022(1998)およびAngewandte Chemie International edition 40.2671-2673(2001)に記載の手法に従い、行うことができる。夫々のヌクレオチド残基に対応するホスホアミダイトモノマーを合成し、既存のDNA合成機を使用することにより、所望のヌクレオチド残基を導入したDNAエンザイムを合成することができる。この場合、ポリメチレン鎖は様々な長さのものを用いることができるが、未置換またはアルキル基で置換されたエチレン鎖またはトリメチレン鎖が好ましい。また、この場合、導入すべき有機基は、エチレン鎖の場合にはいずれかの炭素原子に、トリメチレン鎖の場合には中央の炭素原子に共有結合的に導入するのが好ましい。
- [0022] 次に、DNAエンザイムのRNA切断活性を制御する方法について説明する。まず、特定波長の光を照射することにより平面構造と非平面構造とに構造異性化するアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されたDNAエンザイムを用い、これに特定波長の光を照射する。これにより平面構造と非平面構造とに可逆的に前記有機基を構造異性化させることができ、RNA切断活性が制御可能となる。ここで、DNAエンザイムの塩基配列は触媒活性ループを除き、基質RNAと相補的な塩基である。ただし、RNAの塩基配列は、特に制限されるものではない。
- [0023] また、前記ヌクレオチド残基の導入位置が触媒活性ループの3'側の端であれば本発明のDNAエンザイムとなり、高いRNA切断活性を示すことになるが、本発明の活性制御方法は前記導入位置は特に制限されるものではなく、基質RNAと相補的なオリゴヌクレオチド中であつてもよい。かかるDNAエンザイムは、例えば、次式で表される。



- [0024] 上記式中、AおよびBは水素原子、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを表す。但し、AおよびBが共に水素原子である場合はない。Xはアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基を表す。Rは未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20、好ましくは1〜10、より好ましくは1〜4のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20、好ましくは2〜10、より好ましくは2〜4のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシル基を表す。
- [0025] 前記Xは、好ましくは、アゾベンゼンまたはその誘導体である。この場合、光照射による可逆的な構造異性化による酵素活性の制御機能を害しない限り、ベンゼン環にいかなる置換基を有していてもよく、また、ヌクレオチド残基との結合部にいかなる介在基を有していてもよいが、好ましくはアゾベンゼンのパラ位の置換基および介在基は、ベンゼン環と共鳴構造をとらない基とする。
- [0026] パラ位におけるカルボキシル基、アミノ基、ニトロ基のような置換基およびパラ位におけるアミド結合は、パラ位に共鳴構造をとるため、アゾベンゼンはシス体(非平面構造)とトランス体(平面構造)へ熱的に異性化しやすくなるためである。なお、メタ位の置換基はニトロ基以外の基であることが好ましい。Xとしては、例えば、次式(IV)、(V)または(VI)で表される有機基を挙げることができる。



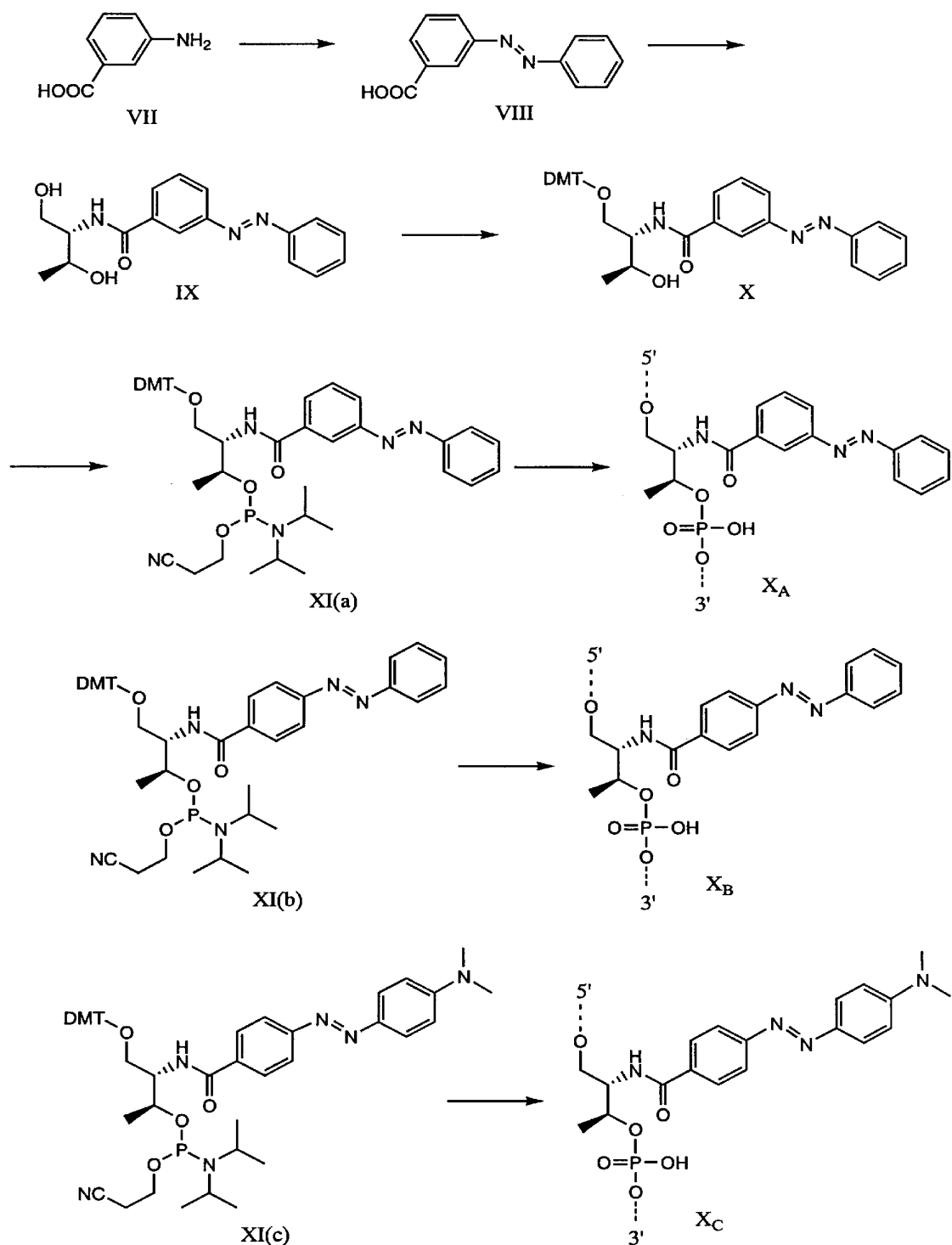
[0027] 上記式(IV)、(V)および(VI)中、 R^{31} 、 R^{41} 、 R^{51} は夫々直接の結合；未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20、好ましくは1〜10、更に好ましくは1〜4のアルキレン基、または未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20、好ましくは2〜10、更に好ましくは2〜4のアルケニレン基である。Qは、直接の結合、酸素原子、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{CO}-$ 基または $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-$ 基、但し $n=1\sim 5$ である。 $\text{R}^{32}\sim\text{R}^{37}$ 、 R^{39} 、 R^{40} 、 $\text{R}^{42}\sim\text{R}^{47}$ 、 R^{49} 、 R^{50} 、 $\text{R}^{52}\sim\text{R}^{57}$ 、 R^{59} 、 R^{60} は夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20、好ましくは1〜10、更に好ましくは1〜4のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20、好ましくは2〜10、更に好ましくは2〜4のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシル基を表す。また、 R^{38} 、 R^{48} 、 R^{58} は、夫々独立に、未

置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20、好ましくは1〜10、更に好ましくは1〜4のアルキル基もしくはアルコキシ基;未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20、好ましくは2〜10、更に好ましくは2〜4のアルケニル基もしくはアルキニル基;水酸基;またはハロゲン原子を表す。また、好ましくは、式(IV)中において $-Q-R^{31}-$ はアゾベンゼンと共鳴構造をとらない介在基である。

- [0028] 前記有機基を構造異性化させるために照射する光は、該有機基の異性化が可能ならば紫外領域から赤外領域までのすべての波長の光を用いることができるが、DNAを損傷させない300nm以上が好ましい。例えば、300〜400nmの光(UV光)を照射することにより、一の異性体から他の異性体に構造異性化し、400nm以上の光(可視光)を照射することにより、その逆の変化を起こすことができる。

実施例

- [0029] 以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明をするが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。
- [0030] 合成例1
- 「アゾベンゼン誘導体導入DNAエンザイムの合成」
- 以下のスキームにて合成を行った。



先ず、3-アミノ安息香酸VIIを酢酸に溶解させ、これにニトロソベンゼンの酢酸溶液を混合し、12時間室温で攪拌することで、3-フェニルアゾ安息香酸VIIIの粗生成物を得た。次に、得られた粗生成物をエタノールを用い、再結晶を行うことにより精製し

た。得られた3-フェニルアゾ安息香酸VIIIとD-トレオニールをN, N-ジメチルホルムアミド(DMF)中で、ジシクロヘキシルカルボジイミドと1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの存在下にて反応させることにより3-フェニルアゾ安息香酸VIIIとD-トレオニールとがアミド結合によって結合された化合物IXの粗生成物を得た。

[0031] 次に、得られた化合物IXをカラムクロマトグラフ法で分離精製した後、Angewandte Chemie International edition 40.2671-2673(2001)記載の手法に従い、ピリジン・ジクロロメタン混合溶媒中で4-ジメチルアミノピリジンの存在下にて4, 4'-ジメトキシトリチルクロリドを反応させることにより、4, 4'-ジメトキシトリチル(DMT)基で一方の水酸基を保護した化合物Xの粗生成物を得た。得られた化合物Xをカラムクロマトグラフ法で分離精製した。次に、The Journal of Organic Chemistry 62.846-852(1997)、Tetrahedron Letters 39.9019-9022(1998)記載の手法に従い、得られた化合物Xと2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトをアセトニトリル中で、1H-テトラゾール存在下にて反応させることにより、もう一方の水酸基にホスホロアミジドが付加したホスホアミダイトモノマーXI(a)の粗生成物を得た後、カラムクロマトグラフ法で分離精製した。

[0032] また、3-フェニルアゾ安息香酸VIIIの代わりに4-フェニルアゾ安息香酸を用いる以外は上記と全く同様の方法によって、ホスホロアミダイトモノマーXI(b)を合成した。更に、3-フェニルアゾ安息香酸VIIIの代わりにパラ-メチルレッドを用いる以外は上記と全く同様の方法によってホスホロアミダイトモノマーXI(c)を合成した。

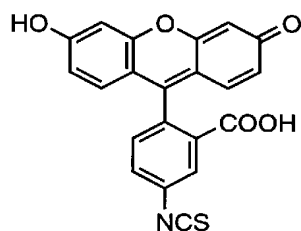
[0033] 最後に、本発明であるアゾベンゼン誘導体を導入した化学修飾DNAエンザイムの合成を行った。本実施例では、10-23型のDNAエンザイムを合成した。化学修飾DNAエンザイムの合成はABI394型DNA合成機を使用し、上記の得られたホスホアミダイトモノマーXI(a)〜(c)と4つの天然の塩基に対応する市販のホスホアミダイトモノマーを用い、下記の塩基配列を持つ本発明のDNAエンザイム(DNA-1A:配列番号4、DNA-1B:配列番号5、DNA-1C:配列番号6)を合成した。通常のプロトコルに従い、粗生成物を得た後、その粗生成物をゲル精製、高速液体クロマトグラフィー精製を行い精製した。また、比較例として、天然の4つの塩基のみで構成されるDNAエンザイム(DNA-N:配列番号3)も、上記と同様の手法で合成した。夫々の塩

塩基配列を下記の表1に示す。塩基配列中、下線部の引かれた塩基配列は触媒活性ループを表す。

[0034] [表1]

DNA エンザイム	塩基配列
DNA - N (配列番号 3)	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGATTCTTCCT - 3'
DNA - 1A (配列番号 4)	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGAX _A TTCTTCCT - 3'
DNA - 1B (配列番号 5)	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGAX _B TTCTTCCT - 3'
DNA - 1C (配列番号 6)	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGAX _C TTCTTCCT - 3'

[0035] 全てのDNAエンザイムはMALDI-TOFMSにより同定した。また、基質として用いたRNAの配列は以下の通りである。基質RNAを蛍光ラベルするために、5'末端に次式、



で表されるフルオレセインイソチオシアナート(FITC)を導入した。

5'-(FITC)-AGGAAGAAGCCCUUCAG-3' (配列番号7)

[0036] 実施例1〜3、比較例1

「RNA切断実験」

合成例1にて合成したDNAエンザイム(DNA-N:配列番号3、DNA-1A:配列番号4、DNA-1B:配列番号5、DNA-1C:配列番号6)を用いて、以下の手順に従ってRNA切断実験を行った。まず、DNAエンザイムの水溶液を4 μ L、基質RNAの水溶液4 μ L、更にバッファー水溶液4 μ Lをマイクロチューブに採取し、室温で十分

に攪拌・混合した。反応液中に含まれる各物質の最終濃度は以下の通りとなるように調製した。

DNAエンザイム: $16 \mu\text{mol/L}$

基質RNA: $1.6 \mu\text{mol/L}$

Tris-HCl: 50mmol/L

塩化マグネシウム: 10mmol/L

塩化ナトリウム: 1mol/L

[0037] 次に、得られた反応溶液を 37°C に調整した恒温槽に移し、比較例1 (DNA-N:配列番号3) および実施例1〜2 (DNA-1A:配列番号4、DNA-1B:配列番号5) は1時間、実施例3 (DNA-1C:配列番号6) は40分間、反応させた。その後、尿素 10mol/L とエチレンジアミン四酢酸 50mmol/L を含む水溶液を $12 \mu\text{L}$ 加えて反応を停止させ、アクリルアミドゲル電気泳動法によりRNAの切断断片と未切断のRNAを分離した。最後に、このゲルをフルオロイメージャー (FLA-3000: 富士写真フイルム社製) を用いて 470nm の光でFITCを励起し、 520nm の蛍光強度をモニターすることで、RNAの切断量を定量化した。その切断結果を下記の表2に示す。

[0038] [表2]

	DNA エンザイム	切断量 (%)
比較例 1	DNA - N (配列番号 3)	12.5
実施例 1	DNA - 1A (配列番号 4)	38.8
実施例 2	DNA - 1B (配列番号 5)	36.0
実施例 3	DNA - 1C (配列番号 6)	33.3

[0039] 表2に示す結果より、DNAエンザイムの触媒活性ループの3'側の端に平面性の高い分子を化学的に導入することで、天然の塩基のみから形成される従来のDNAエンザイムより、高いRNA切断活性を有することが確認された。また、メターアゾ (実施例1)、パラアゾ (実施例2)、メチルレッド (実施例3) の三者とも同程度のRNA切断活性を有することから、平面状物質であれば、インターカレートして安定化させること

ができると考えられる。

[0040] 実施例4ー7、比較例2

「RNA切断活性の光制御」

合成例1の方法に準拠して、DNAエンザイムを追加合成した。その塩基配列を下記の表3に示す。塩基配列中、下線の引かれた塩基配列は触媒活性ループを表す。

[0041] [表3]

DNA エンザイム	塩基配列
DNA - 2A (配列番号 8)	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGATX _A TCTTCCT - 3'
DNA - 3A (配列番号 9)	5' - CTGAAGGGGGCTAGCTACAACGATTCTX _A TTCCT - 3'

[0042] 得られたDNAエンザイムを用い、実施例1ー3と全く同様の手順に従い、室温で反応溶液を調製した。次に、これを37℃の恒温槽に移し、UV-A蛍光ランプ (FL6BL-A: 東芝製) を用いてUV-D36Cフィルター (朝日テクノグラス製) を通した紫外光を照射しながら所定の時間反応させた。この条件下でのUV光の強度は、 $100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ 以下であった。また、同じ組成の反応溶液を、UV光を照射しない事以外は全く同じ条件で反応させた。その後、実施例1ー3と同様に尿素-EDTA溶液を加えて反応を停止させ、アクリルアミドゲル電気泳動法によりRNAの切断断片と未切断のRNAを分離した。最後に、このゲルをフルオロイメジャー (FLA-3000: 富士写真フイルム社製) を用いて470nmの光でFITCを励起し、520nmの蛍光強度をモニターすることで、RNAの切断量を定量化した。その切断結果を下記の表4に示す。

[0043] [表4]

	DNA エンザイム	切断量 (%)		反応時間
		UV 光照射下	UV 光未照射	
比較例 2	DNA - N (配列番号 3)	37.3	37.6	4 時間
実施例 4	DNA - 1A (配列番号 4)	12.4	38.8	1 時間
実施例 5	DNA - 1B (配列番号 5)	21.7	39.0	1 時間
実施例 6	DNA - 2A (配列番号 8)	18.0	29.4	4 時間
実施例 7	DNA - 3A (配列番号 9)	12.3	18.5	4 時間

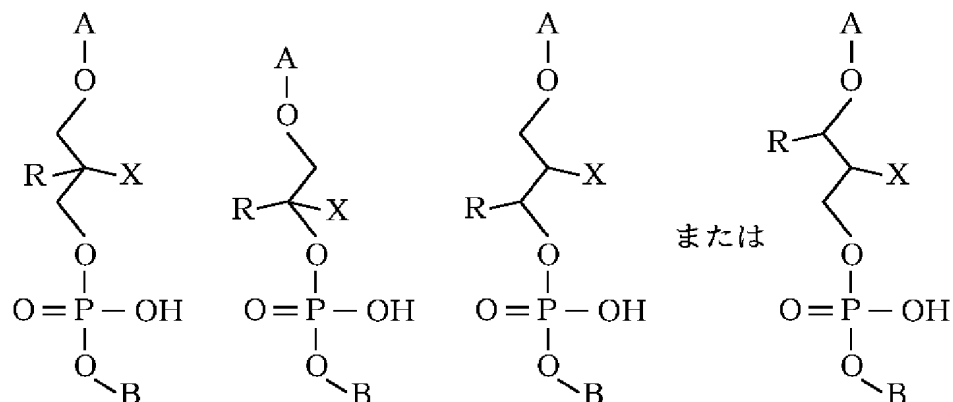
[0044] 表4に示す結果より、特定波長の光の照射により平面構造と非平面構造とに構造異性化する有機基が結合された残基が触媒活性ループの3'側の端または基質RNAと相補的なオリゴヌクレオチド中に導入されたDNAエンザイムに対し、特定波長の光を照射することにより該有機基を平面構造と非平面構造とに可逆的に構造異性化させることで、RNA切断活性を制御できることが確認された。また、平面構造と非平面構造とに構造異性化する有機基が結合されたヌクレオチド残基を触媒活性ループの3'側の端および基質RNAと相補的なオリゴヌクレオチド中の両方に導入されたDNAエンザイムにおいても、光照射によりRNA切断活性を制御することができると考えられる。

産業上の利用可能性

[0045] 本発明の高活性DNAエンザイムを使用することで、従来と比較し、メッセンジャーRNAのレベルでの遺伝子発現の抑制を効率的に行うことが可能となる。また、光照射によりDNAエンザイムの酵素活性を制御することができることにより、遺伝子発現を可逆的に制御することが可能となる。これにより、バイオテクノロジーの種々の分野において、その有用性が期待できる。

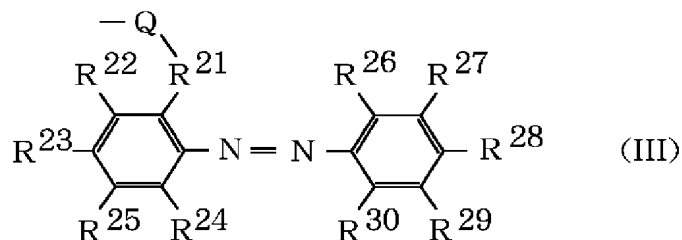
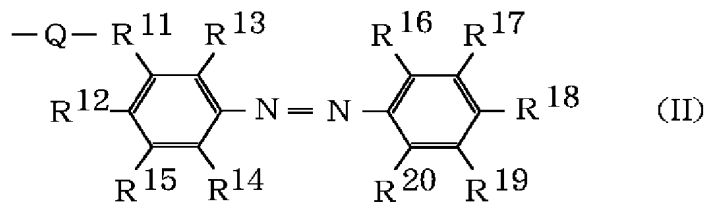
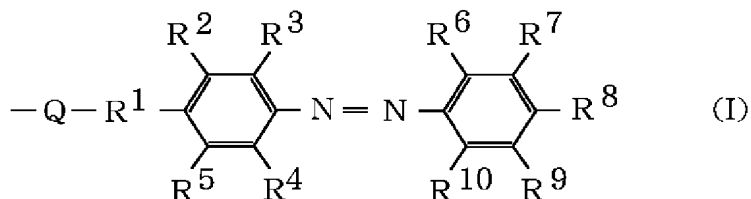
請求の範囲

- [1] DNAエンザイムの触媒活性ループの3'側の端に、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基が導入されていることを特徴とするDNAエンザイム。
- [2] 次式、



(上記式中、Aは触媒活性ループ端を表し、Bはヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを表し、Xはアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基を表し、Rは水素原子または炭素原子数1〜4のアルキル基を表す)で表される請求項1記載のDNAエンザイム。

- [3] 前記Xが次式(I)、(II)または(III)、



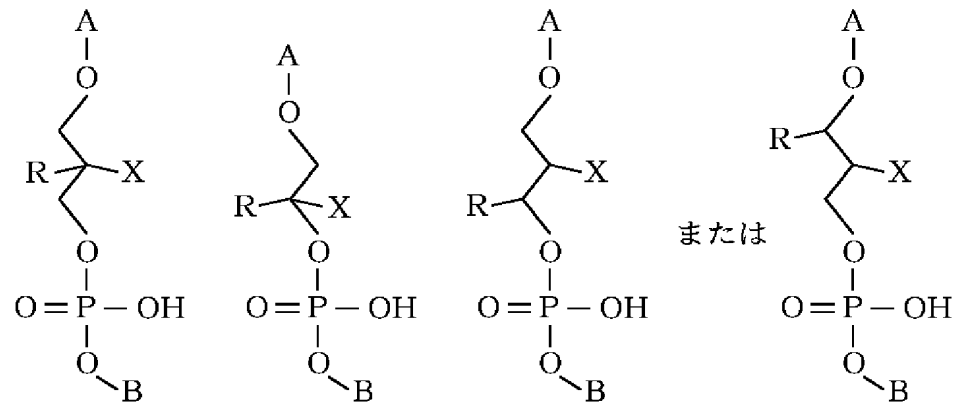
(上記式中、 R^1 、 R^{11} 、 R^{21} は夫々直接の結合；未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20のアルキレン基、または未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20のアルケニレン基であり、Qは直接の結合、酸素原子、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{CO}-$ 基または $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-$ 基、但し $n=1\sim5$ であり、 $\text{R}^2\sim\text{R}^{10}$ 、 $\text{R}^{12}\sim\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{22}\sim\text{R}^{30}$ は夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1〜20のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2〜20のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシル基を表す)で表される請求項2記載のDNAエンザイム。

- [4] DNAエンザイムのRNA切断活性を制御するにあたり、アゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基が結

合されたヌクレオチド残基が導入されているDNAエンザイムに対し、特定波長の光を照射することにより該有機基を平面構造と非平面構造とに可逆的に構造異性化させることを特徴とするDNAエンザイムの活性制御方法。

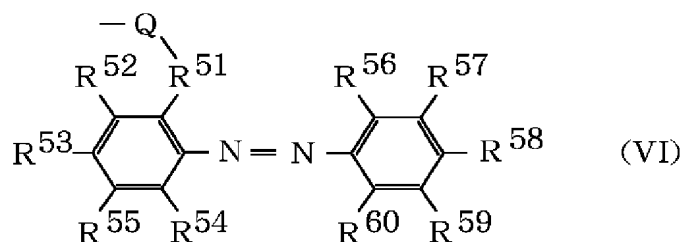
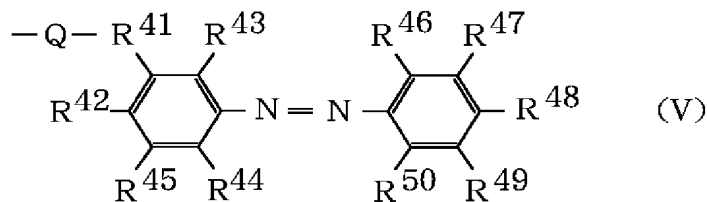
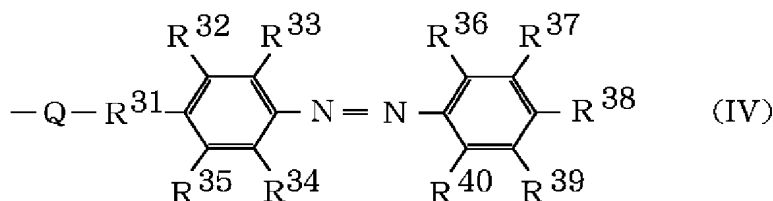
[5] 前記ヌクレオチド残基の導入位置が触媒活性ループの3'側の端である請求項4記載のDNAエンザイムの活性制御方法。

[6] 前記DNAエンザイムが次式、



(上記式中、Aは触媒活性ループ端を表し、Bはヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを表し、Xはアゾベンゼン、スピロピラン、スチルベンおよびこれらの誘導体からなる群から選ばれるいずれかの有機基を表し、Rは水素原子または炭素原子数1〜4のアルキル基を表す)で表される請求項5記載のDNAエンザイムの活性制御方法。

[7] 前記Xが次式(IV)、(V)または(VI)、



(上記式中、 R^{31} 、 R^{41} 、 R^{51} は夫々直接の結合；未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1～20のアルキレン基、または未置換もしくはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2～20のアルケニレン基であり、Qは直接の結合、酸素原子、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{CO}-$ 基または $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-$ 基、但し $n=1\sim5$ であり、 $\text{R}^{32}\sim\text{R}^{37}$ 、 R^{39} 、 R^{40} 、 $\text{R}^{42}\sim\text{R}^{47}$ 、 R^{49} 、 R^{50} 、 $\text{R}^{52}\sim\text{R}^{57}$ 、 R^{59} 、 R^{60} は夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1～20のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数2～20のアルケニル基もしくはアルキニル基；水酸基；ハロゲン原子；アミノ基；ニトロ基；またはカルボキシル基であり、 R^{38} 、 R^{48} 、 R^{58} は、夫々独立に、未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシル基で置換された炭素原子数1～20のアルキル基もしくはアルコキシ基；未置換またはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、ニトロ基、カルボキシ

ル基で置換された炭素原子数2〜20のアルケニル基もしくはアルキニル基;水酸基;
またはハロゲン原子を表す)で表される請求項6記載のDNAエンザイムの活性制御
方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C07H21/04, C12N9/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C07H21/04, C12N9/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE(JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN),
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tetsu YAMAZAWA et al., "Kakusan Kino no Hikari Seigyo o Mezashita Shushoku Oligonucleotide no Sekkei", Azobenzene Donyu ni yoru DNA Enzyme no Hikari Seigyo", Polymer Preprints, Japan, 50(5), 2001, page 977	1-7
A	S.W. Santoro, et al., A general purpose RNA-cleavings DNA etzyme, Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 94(9), 1997, p. 4262-6	1-7
A	H. ASANUMA, et al., Photo-responsive oligonucleotides carrying azobenzene in the side-chains, Tetrahedron Letters, 39(49), 1998, p. 9015-8	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 April, 2005 (11.04.05)

Date of mailing of the international search report
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003052

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	Y. Lin, et al., Light-regulated Catalysis by an RNA-cleaving Deoxyribozyme, Journal of Molecular Biology, 341(4), 2004.08, p.887-92	1-7
T	Takeshi KURAMOCHI et al., "Azobenzene Donyu ni yoru DNA Enzyme no Kokinoka", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 84(2), 11 March, 2004 (11.03.04), page 1070	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003052

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: parts of 1, 2 and 4 to 6
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See extra sheet.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003052

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)**Claims 1 and 5**

It is unknown what position corresponds to "the end in the 3'-side" as set forth in the above claims. It is unknown whether DNA-2A and DNA-3A given in Table 3 correspond to examples having azobenzene transferred into "the end in the 3'-side" or not. Therefore, it appears that the above claims are not clearly described.

Claims 1, 2, 4 and 6

It is unknown the "derivatives" as set forth in the above claims mean compounds of what structure in practice. Therefore, it appears that the above claims are not clearly described.

It is also unknown what compounds other than the compounds presented in EXAMPLES, etc. are involved in the scope of the "derivatives". Thus, the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

Claims 1, 2 4 and 6

Concerning the "DNA enzyme" as set forth in the above claims, those relating to "azobenzene" are exclusively indicated as being useful in EXAMPLES, etc. Namely, it is unknown whether or not other DNA enzymes relating to spiropyran and stilbene are also useful. Thus, the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

Claims 1 and 4

It is unknown what compounds correspond to "a nucleotide residue carrying an organic group selected from the group consisting of azobenzene, ..." as set forth in the above claims. Although a "DNA enzyme" according to the above claims is represented by the formula given in claim 2, for example, the organic group transferred between "A" and "B" is not a nucleotide residue. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described.

No search was made on the inventions which are claimed in claims not clearly described as discussed above or which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07H21/04, C12N9/22

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07H21/04, C12N9/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST ファイル (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN),
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	山澤哲 他, 核酸機能の光制御を目指した修飾オリゴヌクレオチド の設計 アゾベンゼン導入による DNA Enzyme の光制御, 高分子学会 予稿集, 50 (5), 2001, p. 977	1-7
A	S. W. Santoro, et. al, A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme, Proc Natl Acad Sci U S A, 94 (9), 1997, p. 4262-6	1-7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 04. 2005

国際調査報告の発送日

26. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

9286

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	H. Asanuma, et. al, Photo-responsive oligonucleotides carrying azobenzene in the side-chains, Tetrahedron Letters , 39 (49), 1998, p. 9015-8	1-7
T	Y. Lin, et. al, Light-regulated Catalysis by an RNA-cleaving Deoxyribozyme, Journal of Molecular Biology , 341 (4), 2004.08, p. 887-92	1-7
T	倉持壮 他, アゾベンゼン導入による DNA エンザイムの高機能化, 日本化学会講演予稿集, 84 (2), 2004.03.11, p. 1070	1-7

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1,2,4-6の一部 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 1、5

上記請求の範囲における「3'側の端」とは、どの位置を示しているか不明である。表3のDNA-2A及びDNA-3Aは、「3'側の端」にアゾベンゼンが導入されている例であるかどうか不明である。したがって、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

請求の範囲 1、2、4、6

上記請求の範囲における「誘導体」は、具体的にどのような構造を有する化合物であるか不明である。したがって、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

また、該「誘導体」について、実施例等で示されている化合物以外に、どのような化合物が該当するか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲 1、2、4、6

上記請求の範囲における「DNA エンザイム」について、実施例等で有用性が示されているものは、「アゾベンゼン」に係るものだけであり、それ以外のスピロピラン、スチルベンに係るものについては有用性が不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲 1、4

上記請求の範囲における「アゾベンゼン、・・・から選ばれるいずれかの有機基が結合されたヌクレオチド残基」は、どのような化合物か不明である。例えば、上記請求の範囲に係る「DNA エンザイム」は、請求の範囲2の式で表されるが、「A」及び「B」の間に導入された有機基はヌクレオチド残基ではない。したがって、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

なお、上記の如く請求の範囲が明確に記載されていないか、または、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。